

НАНОБИОГИБРИДНЫЕ СТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ ПЛАЗМОННЫХ ИЛИ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОЧАСТИЦ И РЕТИНАЛЬ-СОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ

©2020 г.

В. А. ОЛЕЙНИКОВ^{1,2},

Д. О. СОЛОВЬЕВА^{1,2}, С. Ю. ЗАЙЦЕВ^{1,3}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва,

² ИФИБ НИЯУ «МИФИ», Москва,

³ ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, п. Дубровицы,
Московская область

I. Введение. II. Супрамолекулярные системы на основе ретиналь-содержащих белков. III. Гибридные структуры на основе ретиналь-содержащих белков и КТ. IV. Плазмонные наночастицы. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Родопсины — это мембранные светочувствительные белки, обеспечивающие трансмембранное разделение заряда («протонный насос») при поглощении кванта света. Такое свойство используется для широкого ряда важнейших биологических функций животных и бактерий [1–8]. Общим для белков этого типа, является наличие хромофора — ретиналя (полиеновый альдегид), использующего энергию света для выполнения нативных функций этих белков.

Принятые сокращения: БР — бактериородопсин, ПМ — пурпурные мембраны, Мц — метилцеллюлоза, ПМ–ПВС — полимерные матрицы типа поливинилового спирта), ПЭДОТ:ПСС — поли(3,4-этилендиокситиофен):поли(стиролсульфонат), ИТО — оксид индий-олово (indium-tin oxide), КТ — квантовые точки, FRET — Ferster resonance energy transfer, ФРПЭ — Ферстеровский резонансный перенос энергии, ПДАДМАХ — хлорид полидиаллилдиметиламмония, РVP — поливинилпирролидон, AgNPs, AgНЧ — серебряные наночастицы), КР — комбинационное рассеяние, ГКР — гигантское комбинационное рассеяние.

Адрес для корреспонденции: voleinik@mail.ru

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-14-00171 (О.В.А. и С.Д.О. — гибриды на основе КТ и AgНЧ) и РФФИ 17-00-00394 (З.С.Ю. — монослойные структуры).

Среди важнейших ретиналь-содержащих мембранных белков (зрительный родопсин; бактериородопсин, галородопсин), бактериородопсин (БР) является наиболее доступным и имеет оптимальные свойства для технологического применения [1, 2, 4–6, 8–11].

Простота выделения БР связана с его концентрированием в доменах «пурпурных мембран» (ПМ) хорошо изученной галофильной бактерии – *Halobacterium salinarum* [12–14].

Бактериородопсин был впервые обнаружен около 50 лет назад [15]. К началу 2000-х были определены: его структура, свойства и механизмы его функционирования [16]. Однако потенциальные возможности применения этого белка оказались столь привлекательными, что объем исследований, связанных с применением самого БР, его мутантных вариантов, а так же гибридных материалов, содержащих БР, в самых разных областях, не снижается, а скорее возрастает. Это проявляется, в частности, в регулярном появлении обзоров по применению БР. Недавний обзор по применению БР в биоэлектронике опубликованный в 2017 году [17], касается в основном применения БР в электронной технике и сенсорике. Подробно рассмотрены вопросы создания фотовольтаических элементов, оптических элементов памяти, голографических процессоров, сенсоров движения, сенсоров рентгеновского излучения, возможности протезирования сетчатки, и др.

Принципиальным шагом в развитии потенциала устройств на основе БР является формирование наногибридных структур, объединяющих БР или фрагменты пурпурных мембран, содержащих счетное количество упорядоченных молекул БР с наночастицами. Это направление активно развивается в, что отражено в прекрасном обзоре по биогибридным материалам на основе БР [18]. Однако стремительность развития этой области, появление новых данных, а также невозможность охватить весь объем материала обуславливают необходимость регулярного представления новых данных. Настоящий обзор призван заполнить некоторые пробелы, а главное, отразить последние результаты, полученные за последние 4–5 лет.

Мы рассмотрим вопросы формирования материалов на основе гибридов БР с флуоресцентными полупроводниковыми нанокристаллами (квантовыми точками) и с плазмонными наночастицами из благородных металлов (серебро, золото). Будут приведены последние данные по формированию тонких (моно-) и толстых (мульти-) слоев из материалов, включающих БР и гибриды БР/наночастица.

II. СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ РЕТИНАЛЬ-СОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОРОДОПСИНА

Бактериородопсин представляет собой мембранный белок. Его полипептидная цепь состоит из 248 аминокислот (ММ ~26500 Да), изогнута и образует семь трансмембранных α -спиралей, пронизывающих бислои плазматических мембран бактерий. Указанные семь α -спиралей образуют две «арки»: внешнюю арку из спиралей E, F, G, A и внутреннюю арку из спиралей B, C, D. Структура и конформационные изменения БР были изучены методом электронной кристаллографии с разрешением 0.32 нм в плоскости мембраны и 0.36 нм по вертикали [7]. По данным электронографического и рентгеноструктурного анализа [3, 7], пурпурные мембраны представляют собой гексагональную двумерную решетку, элементарная ячейка которой включает 3 молекулы белка и 12–14 молекул липидов, причем такая мембрана асимметрична. Только структура из трех молекул белка как единого функционального элемента позволяет образовать трансмембранную пору. На каждую молекулу белка приходится хромофор (ретиналь), химически присоединенный к лизину 216 в спирали посредством основания Шиффа. После воздействия кванта света происходит изомеризация ретиналя из транс- в цис-конформацию (*all-trans* \rightarrow *13-cis*), рис. 1, что соответствует переходу из основного состояния с λ_{\max} 568 нм (bR_{568}) в М-форму с λ_{\max} 412 нм (M_{412}). Обратный переход в фотоцикле белка связан с переносом протона из цитоплазмы через мембрану во внешнюю среду. Подобная трансформация из основного состояния получила название – фотоцикл БР. Фотоцикл включает в себя циклический переход из основной формы под действием света через несколько промежуточных форм (интермедиатов) обратно в основную. Каждая промежуточная форма фотоцикла поглощает свет определенной длины волны и переходит в следующую форму за определенное время, рис. 1 [12]. Каждая переходная форма в фотоцикле обозначается латинской буквой, как правило, с индексом длины волны поглощения света, т.е. bR_{568} , J_{600} , K_{590} , L_{550} , M_{412} , N_{560} , O_{640} , P_{490} , Q_{380} . Кроме того, существует темновая (темно-адаптированная) форма D_{548} .

Наиболее важные для биотехнологического использования особенности БР (при его фотоактивации): изменение максимума поглощения с 568 до 412 нм и обратно (переход из основной формы в M_{412} и обратно); генерация фототока и фотопотенциала; изменение рН внутри и вне клеток или модельных липосом за счет векторного переноса протона; возможность многократного проведения всех указанных выше процессов без денатурации белка; доступность и

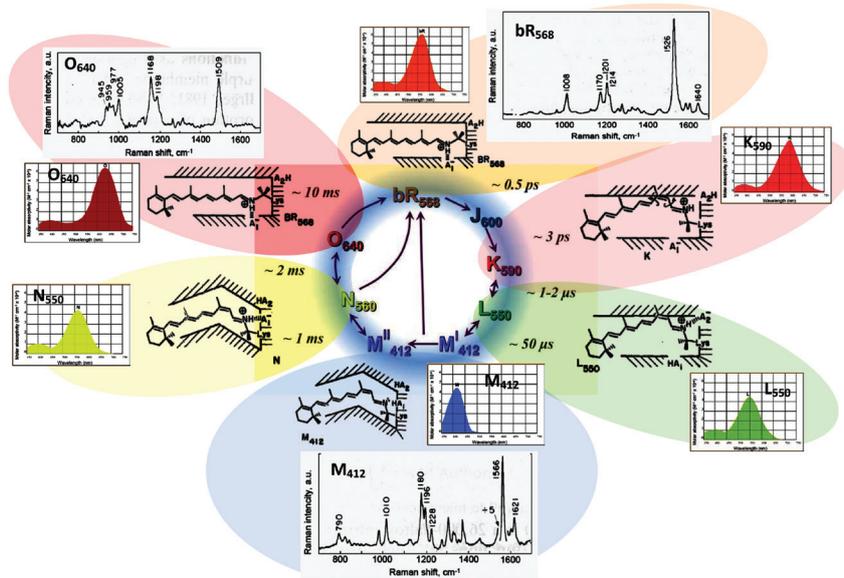


Рис. 1. Параметры фотоцикла бактериородопсина: спектры поглощения форм БР, спектры комбинационного рассеяния некоторых форм БР и структурные формулы форм БР: твердыми стенками показано пептидное окружение БР.

относительная простота получения препаратов, содержащих БР в нативном состоянии.

Помимо дикого типа БР распространено применение мутантных форм бактериородопсина. Для приложений в электронике, наиболее интересен мутант БР-D96N. В нем аспарагиновая кислота (Asp) в положении 96 заменена на непротонирующийся аспарагин (Asn). В природном белке (БР дикого типа) Asp-96 выполняет функцию донора протона, обеспечивая быстрое протонирование основания Шиффа ретиналя и возврат его в основное состояние из М-формы. При отсутствии донора Asp-96 репротонирование основания Шиффа происходит непосредственно протоном из внешней среды, в результате чего время жизни депротонированной М-формы возрастает на несколько порядков [19].

В целом, БР в составе ПМ является уникальным мембранным белком, преобразующим физическую энергию (кванты света) в химическую энергию (макроэргические связи молекул АТФ) и механическую энергию (например, движение жгутиков бактерий), что делает его перспективным компонентом функциональных планарных систем.

ОРИЕНТИРОВАННЫЕ СЛОИ ИЗ ПУРПУРНЫХ МЕМБРАН
И БАКТЕРИАЛЬНОГО РОДОПСИНА

Монослои из ПМ или из очищенных белков типа бактериального или зрительного родопсинов представляют собой наиболее яркие и хорошо описанные примеры модельных мембранных систем [1, 2, 4–6, 8, 9, 20, 21,]. В первых экспериментах в лаборатории Стоккениуса по получению монослоев ПМ их, в чистом виде или в смеси с соевым лецитином, наносили на границу раздела жидкость/газ из раствора в гексане (как наиболее удобном неполярном органическом растворителе); затем эта методика была модифицирована для других органических растворителей и смесей органических растворителей и воды (большое число таких первоначальных данных суммированы в монографии [20]). В ряде работ [20–24] было показано, что ПМ частично денатурируют при смешении органических растворителей с водной субфазой, что может быть связано как с разрушением гидрофобных взаимодействий внутри белка, так и с исключением из его трехмерной структуры молекул липидов. В большинстве случаев наиболее перспективным является метод получения монослоев ПМ или БР при их нанесении из водных дисперсий [20, 22]. Поскольку БР является достаточно гидрофобным белком, то неудивительно, что он, даже без добавления специальных липидов, способен образовывать относительно стабильные монослои на границе раздела фаз. Обнаружено, что ПМ преимущественно ориентируются цитоплазматической (внутренней) стороной в водную субфазу, и при переносе монослоев ПМ на гидрофильные подложки порядка 85% ПМ были адсорбированы в ориентации цитоплазматической стороной мембраны к поверхности стекла [7, 11, 25–31].

Необходимо отметить, что, среди большого числа работ по этой теме, параметры монослоев ПМ или БР количественно описаны только в нескольких [21, 22, 24, 32, 33], причем наиболее достоверными являются данные, приведенные в обзорных работах [22, 33]. Из данных работы [33] следует, что изотерма для монослоя ПМ на 100 мМ NaCl имеет небольшой перегиб в области $20 \text{ мН}\cdot\text{м}^{-1}$ и область коллапса при $46 \text{ мН}\cdot\text{м}^{-1}$. Как поверхностный потенциал, так и «коэффициент сжатия» монослоя пурпурных мембран имеют максимум в этой же области (около $20 \text{ мН}\cdot\text{м}^{-1}$) при площади порядка 5 нм_2 на молекулу БР [33]. Эти параметры, по мнению авторов, соответствуют максимально плотной упаковке ПМ в монослое. Это подтверждают и измерения толщины монослоя, составляющей около 3.8 нм [9, 33] (при поверхностных давлениях ниже $35 \text{ мН}\cdot\text{м}^{-1}$), что практически соответствует размеру гидрофобных α -спиралей ПМ [7].

При более высоких давлениях, особенно вблизи области коллапса монослоя толщина пленки увеличивается до 5.1 нм, что авторы [9] объясняют постепенным образованием второго слоя над уже сформированным монослоем ПМ. По нашему мнению, этот эффект связан с переходом молекул БР в полностью вертикальное положение относительно поверхности раздела фаз: схематически такой переход может соответствовать переходу трехмерных структур.

Исследованию влияния различных экспериментальных условий на структуру и ориентацию ряда мембранных белков в монослоях на границе раздела вода воздух посвящено много работ, в том числе, уже цитированных выше [8, 9, 24, 32–40]. Наиболее детально эти важные эффекты впервые были исследованы мощным методом поляризационно-модулированной ИК-спектроскопии в работах [9, 41]. Большое число работ за последние 30 лет было выполнено в области получения и исследования пленок ПМ, адсорбированных на бислойных (черных) липидным мембранах (БЛМ) и подобных мембраноподобных подложках, которые представляют собой своеобразные «димерные» слои, состоящие из бислоя липидов, на котором находится БР-липидный слой [28, 42–45].

Одним из наиболее простых методов получения ориентированных пленок, содержащих большие количества ПМ или БР, является использование электрофореза в их растворах или набухших пленках (в т.ч., в смеси с синтетическими полимерами) с постепенным осаждением белка на прозрачную подложку. Последующее высушивание позволяет сохранять как заданную ориентацию белка, так и фотоэлектрические свойства БР. Такие работы впервые начались в научном центре Венгерской академии наук и продолжаются до настоящего времени [30, 46]. Оптические свойства таких пленок характеризовали по изменению времени жизни и относительной амплитуды падения интенсивности поглощения при 400 нм после активации лазерно-оптической системой с фильтром, пропускающим свет с длинами волн выше 500 нм. Было показано, что время жизни М-интермедиата фотоцикла БР составляет порядка 2.2 мс [30]. Такие БР-пленки в ряде работ этой и других групп были использованы как прототипы элементов оптических устройств [30, 46]. В работе [26] были получены БР-пленки с высокими техническими характеристиками: площадью 1 см², толщиной 25 мкм, сопротивлением 10⁹–10¹⁰ Ом и оптической плотностью около 2.0 при 570 нм. БР-пленки, полученные во всех указанных работах [26, 30, 46], генерировали значительные фотопотенциалы при периодическом фотооблучении практически без изменений в течение длительного времени (эксперименты регу-

лярно проводились в течение 2 лет). Особенностью работы [13] явилось создание мультислойной структуры из двух БР-пленок, разделенных оптическими волноводами. Эта структура имела высокий коэффициент фотоиндуцируемого превращения белка из исходной формы bR_{568} в форму M_{412} (в интервале 0.5–0.7), который уменьшался до 0.2 в течение 2-5 часов. Использование различных бифункциональных молекул как сшивающих агентов для БР-пленок позволяло стабилизировать определенные формы интермедиатов БР. Например, образец с соотношением БР : глутаровый альдегид, равным 1 : 5, сохранял указанный коэффициент выше 0.45 в течение 120 дней, другие бифункциональные молекулы и аминокислоты оказались не столь эффективны для поддержания технологических параметров БР-пленок [13].

Достижением [38–40, 46] явилась разработка технологически простых и дешевых методик получения фотохромных материалов (ФХМ) при иммобилизации БР или ПМ в различных полимерных матрицах (желатин, полиакриламид, поливиниловый спирт, метилцеллюлоза, полистирол). Среди всех полимерных пленкообразующих матриц наиболее удобной и надежной является матрица из метилцеллюлозы (Мц) [38]. Использование в качестве полимерной матрицы Мц позволило увеличить $T_{1/2}$, до 70–100 с, то есть почти в $2 \cdot 10^3$ раз больше по сравнению с аналогичными временами в суспензии [38]. Одним из наиболее перспективных направлений применения таких полимерных пленок на основе БР является их использование в фоторефрактивных элементах голографических систем [38].

Авторами [47] показано, что при включении ПМ в полимерные матрицы типа поливинилового спирта (ПМ-ПВС) степень его ориентации достаточно высока и сравнима с таковой для пленок, полученных методом электрофоретического осаждения. В данной работе [47] авторы получили оба типа пленок и напрямую сравнили их по величинам фотоэлектрических сигналов, которые оказались достаточно сходными – порядка 300 мВ при оптической плотности пленок 0.13. Это достаточно большая величина, которая практически соответствует таковой для пленок, полученных ЛБ-методом, если нормировать ее на число молекул БР в конкретной пленке [47]. Более того, при сравнении величин нормированного сигнала генерации второй гармоники в таких пленках обнаружено, что указанный сигнал выше в пленках ПМ-ПВС, чем в пленках ПМ, полученных электрофоретическим осаждением. Авторы [47] объясняют этот необычный факт образованием неоднородностей в пленках ПМ,

полученных электрофоретическим осаждением, при их высушивании, что существенно ухудшает их оптические свойства. По нашему мнению, для качественной работы пленок ПМ, полученных электрофоретическим осаждением, требуется поддерживать постоянную влажность в районе 50–70%. Кроме того, найденные авторами [47] значения нелинейной восприимчивости для пленок ПМ-ПВС составляют: 4.7×10^{-10} отн.ед. для исходной формы БР (568 нм) и 5.0×10^{-11} отн.ед. для М-формы (412 нм), т.е. этот параметр в 10 раз уменьшается после фотоактивации пленки ПМ-ПВС. Кроме того, имеется возможность использовать сигнал генерации второй гармоники для считывания изображений, записанных на таких пленках, без их стирания. Поскольку значения нелинейной восприимчивости пропорциональны оптической плотности и толщине пленки, то авторы [47] считают, что эти значения несложно будет увеличить в несколько раз при существенном уменьшении толщины пленки (с микронов до десятков нанометров) и сохранении той же оптической плотности материала.

В работах [48, 49] была описана гибридная система ориентированных ПМ на проводящем полимерном субстрате, где окисленное состояние полимера контролирует протонный градиент БР. В качестве проводящего полимерного субстрата для гибридной системы использовалась смесь поли(3,4-этилендиокситиофен):поли(стиролсульфонат) (ПЭДОТ:ПСС), которая наносилась на электрод ИТО (оксид индия-олова, indium-tin oxide); толщина полимерного слоя составила ~200 нм. Поверх системы ИТО/ПЭДОТ:ПСС на расстоянии 0.5 мм помещалась стеклянная подложка, покрытая золотом, затем на полимерную систему наносилась дисперсия ПМ ($10 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$, pH 6.8), которую высушивали под внешним напряжением (0.1–10.0 В) [48]. После высушивания толщина слоя ПМ составила ~500 нм и на слой ПМ наносили алюминиевый электрод. При облучении полученной гибридной системы ИТО/ПЭДОТ:ПСС/Al светом с длиной волны 532 нм регистрировался фотоэлектрический ответ около 1.5 нА [49].

Таким образом, для всех указанных перспективных приложений (областей применения материалов на основе ПМ) актуальной задачей является получение ультратонких ориентированных пленок ПМ. На основании сравнения способов получения тонких пленок ПМ и их структурно-функциональных характеристик можно сделать вывод, что однородность и степень ориентации ПМ в таких пленках зависит от способа их получения, возрастаая в ряду: СА (самосборка) < Ленгмюр-Блоджетт < электрофоретическая седиментация [22].

III. ГИБРИДНЫЕ СТРУКТУРЫ НА ОСНОВЕ РЕТИНАЛЬ-СОДЕРЖАЩИХ БЕЛКОВ И КТ

КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ

Одним из наиболее привлекательных объектов в плане формирования гибридных наноструктур на основе БР, являются полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы (квантовые точки, стержни, пластинки). Особенностью фотоцикла БР является последовательное изменение оптических свойств молекулы, в частности спектра поглощения. Область поглощения БР находится в пределах оптического диапазона (380–690) нм [50]. Квантовые точки, путем изменения размеров флуоресцирующего ядра, могут быть настроены на этот диапазон флуоресценции. Например, квантовые точки из CdSe позволяют покрыть диапазон (480–690) нм [51, 52], т.е. диапазон поглощения всех форм БР, кроме форм М (13-*cis*, $\lambda_{\text{полг}} = 412$ нм) и Q (9-*cis*, $\lambda_{\text{полг}} = 380$ нм).

Переход в более коротковолновую область осуществляется заменой одного или обоих компонентов бинарного полупроводника [51, 52]: замена Se на S позволяет сместить диапазон флуоресценции к (380–460) нм, а замена Cd на Zn – в область (360–500) нм. Самый коротковолновый диапазон дает замена обоих атомов, для квантовых точек из ZnS, область флуоресценции составляет (300–380) нм. Использование КТ из этих материалов позволяет селективно воздействовать на M412 и Q380 формы БР.

Размер флуоресцирующего ядра КР составляет (2.5–4.5) нм, что сравнимо с размерами молекул БР. Расстояние между центрами КТ и хромофором БР ретиналем составляет (3,5-6,5) нм, т.е. расстоянием, на котором эффективен перенос энергии по Ферстеровскому механизму (FRET – Ferster resonance energy transfer, ФРПЭ – Ферстеровский резонансный перенос энергии). Квантовые флуоресцентные нанокристаллы являются идеальными донорами, поскольку имея узкий пик флуоресценции, зависящий от размера флуоресцирующего ядра, возбуждаются в очень широкой области. Длина волны возбуждения может быть значительно короче длины волны флуоресценции, находясь в синей области спектра. При этом КТ разных цветов могут возбуждаться одним источником возбуждения. Эффективность ФРПЭ зависит от степени перекрытия спектров излучения донора (КТ) и поглощения акцептора (БР). Выбор размера, и соответственно цвета флуоресценции КТ, позволяет оптимизировать эффект ФРПЭ.

КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ В ПЛЕНКАХ БР,
ФОТОВОЛЬТАИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ

Одним из наиболее перспективных подходов в настоящее время является создание гибридных систем из нескольких функционально и структурно взаимосвязанных наноразмерных компонентов [12–14, 20, 22, 53–62]. Подход, основанный на включении КТ в качестве своеобразных «антенн-конвертеров» (типа фотосистем растений), позволяет использовать свет, который не был бы поглощен БР (от глубокого УФ до синей области оптического спектра), преобразовать эту энергию в фотоны с длинами волн, которые могут поглощаться БР, эффективно передать эту энергию БР в режиме ФРПЭ (Фёрстеровский резонансный перенос энергии) и использовать эту энергию для улучшения его биологической функции [22, 57, 58, 12–14]. Использование БР особенно удобно еще и потому, что в этом белке хромофор (ретиаль) расположен на расстоянии приблизительно 2.5 нм [1, 2, 4–8] от обеих поверхностей пурпурной мембраны (рис. 2а) [63]. Это расстояние намного меньше среднего ферстеровского радиуса (порядка 5 нм), определенного для многих систем с переносом энергии в режиме ФРПЭ [63–68]. Кроме того, специально подобранные в работе [63] КТ имеют широкую область абсорбции, которая хорошо перекрывается с абсорбцией БР в области 400–600 нм, причем интенсивность абсорбции КТ в несколько раз превышает таковую для БР в области 450–600 нм и почти на порядок – при 400 нм (рис. 2б). Таким образом, создаются спектральные условия для эффективного переноса энергии от донора (КТ) при его фотоактивации к акцептору (БР).

Не менее важным условием является адсорбция КТ непосредственно на домены пурпурных мембран, содержащие тримеры БР, что в работе [63] достигается путем функционализации поверхности КТ цистеином или тиогликолевой кислотой. Получение качественных структур такого рода конъюгатов БР/КТ было доказано методом АСМ [63]. Авторами [63] получены изображения регулярно упакованных тримеров БР с расстояниями между ними порядка 6.2 нм и высотой 0.4–0.5 нм. После ассоциации КТ на поверхности ПМ в соотношении КТ:БР=1:2, значительно увеличивается высота ассоциатов (до 1.7–2.0 нм) и уменьшается расстояние между тримеры БР (приблизительно до 6.09 нм). Эти данные указывают на специфическое связывание КТ с участками БР, экспонированными на поверхности ПМ. Причем сохраняется регулярная структура БР в доменах при низких соотношении КТ:БР, тогда как повышение этого соотношения выше эквимолярного приводит к исчезновению регу-

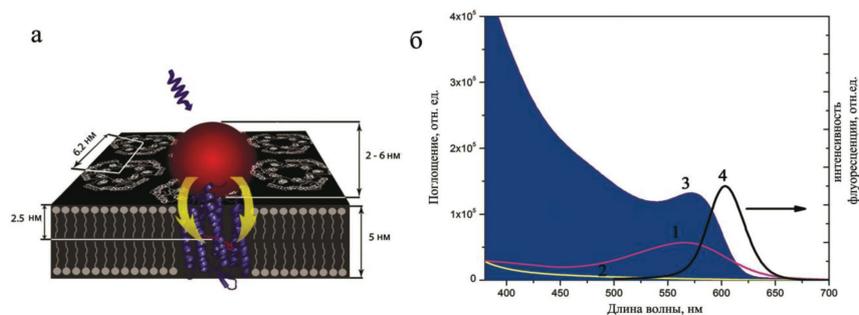


Рис. 2. Структурная организация гибридного материала квантовые точки/пурпурные мембраны (КТ/ПМ) и оптические свойства бактериородопсина (БР) и КТ. Все объекты на (А) изображены в масштабе. Фотоны поглощаются квантовыми точками, иммобилизованными на поверхности ПМ, содержащих БР.

(А) Показано, что каждая молекула БР содержит один хромофор с поглощением в видимой области спектра (ретинаяль показан фиолетовым). Ретинаяль располагается в центре ПМ, на расстоянии около 2.5 нм от каждой из сторон мембраны. Экситон от КТ (донор; показан оранжевым) переносится посредством ФРПЭ на хромофор БР (ретинаяль — акцептор), таким образом инициируя фотоизомеризацию ретиналя, разделение зарядов у основания Шиффа, фотоцикл БР и работу протонного насоса через ПМ. Такая передача энергии также приводит к сильному тушению флуоресценции КТ.

(Б) Спектры поглощения ПМ (фиолетовая кривая), белых мембран (желтая кривая) и одного из типов КТ, использованных в работе (синяя кривая) в УФ- и видимой областях. Спектр флуоресценции этих КТ (черная кривая). Адаптировано из [63] (с любезного разрешения издательства *American Chemical Society*).

лярной структуры КТ/БР доменов и образованию мультислойных структур [63]. Специфическое связывание небольших количеств отрицательно заряженных КТ именно с экспонированными участками БР объясняется наличием в последних большого числа положительно заряженных остатков лизина и аргинина, тогда как окружающие БР липиды мембраны имеют небольшой отрицательный заряд за счет большого числа фосфатных групп, экспонированных на поверхности ПМ.

Такое специфическое взаимодействие КТ с БР приводит к сильному тушению флуоресценции КТ, которое становится практически полным при соотношениях КТ:БР от 1:2 до 1:1 (в случае КТ-590) или от 1:1.2 до 1:1 (в случае КТ-650) [63]. Непосредственным доказательством именно эффекта ФРПЭ, а не других типов тушения

флуоресценции КТ, в указанных случаях является небольшое падение флуоресценции КТ (приблизительно на 20%) в присутствии «обесцвеченных» ПМ, т.е. мембран, в которых ретиналь был тщательно удален в мягких условиях, не повреждающих бислойную структуру мембран и БР в таких мембранах. Это детальное исследование [63] является центральным в серии работ данной группы авторов [63, 64, 66, 67, 69], в которых было тщательно изучено влияние изменения заряда, размеров КТ и толщины органического слоя КТ различных типов на специфичность взаимодействия КТ с БР [68]. Из всех полученных выше данных авторы делают вывод, что функциональные элементы КТ/БР, работающие в режиме ФРПЭ, могут обеспечить новое направление в области молекулярной электроники и фотогальванических элементов с преимуществами в размерах, эффективности свето- и электро- управляемых функций, устойчивости структуры, стабильности, простоте и дешевизне производства. Например, существующие наноразмерные сенсоры используют относительно большие источники света, тогда как КТ как по размерам, так и по свойствам идеально подходят для селективной активации отдельных молекул белка и, таким образом, способствуют миниатюризации сенсорной системы с одновременной возможностью фотозависимого включения-выключения определенных гибридных нано-биоструктур среди большого числа подобных структур на общей интегральной платформе.

Такие перспективы использования гибридных структур привлекают большое внимание ряда других исследователей [27, 36–40, 46, 59, 62, 65, 68, 70–75].

В работах [65, 68] приведены данные по формированию пленочных элементов, содержащих различные белки и КТ, и показано, что влияние ФРПЭ на свойства таких композитных материалов весьма значительны. Например, иммобилизация КТ-537 (CdTe, диаметром 2–3 нм с максимумом флуоресценции при 530–540 нм) на БСА (в отношении 1 к 9) при электрофоретической седиментации не приводит к изменению параметров флуоресценции КТ-537, тогда как иммобилизация КТ-537 на БР (выделенный из штамма S9 бактерии *Halo-bacterial halobium*) приводит к уменьшению флуоресценции КТ-537 на 95% от исходной. Достижением авторов [68] явилось создание гибридной системы КТ/БР, способной генерировать постоянный ток; показаны обратимые фотоэлектрические изменения гибридной системы КТ/БР при возбуждении лазером с длиной волны 410 нм (мощностью 7 мВт·см⁻²). Эти сигналы кардинально отличаются по форме от тех фототоков, которые генерируются в такой же системе

при возбуждении лазером с длиной волны 570 нм (мощностью $6.5 \text{ мВт} \cdot \text{см}^{-2}$) и в системе, содержащей, только БР, под действием света с длиной волны 410 нм, хотя амплитуда во все трех случаях составляет около $45 \text{ нА} \cdot \text{см}^{-2}$. Авторы [68] считают, что обнаруженное ими явление является специфическим именно для гибридной системы КТ/БР при возбуждении светом с длиной волны 410 нм. Авторами [68] предложена следующая модель, чтобы объяснить, как КТ могут выступать в качестве наноразмерных источников света, встроенных в пленки БР, с получением стационарных фототоков, что является ключевым отличием от поведения гибридных систем КТ/БР, о которых сообщалось ранее [63–65, 67]. Поскольку исходное состояние БР (bR_{568}) и М-форма (M_{412}) имеют гораздо большие «времена жизни», чем другие промежуточные формы в фотоцикле БР, то только эти два состояния и рассматриваются авторами [65] в данной модели. В серии экспериментов этих авторов [75] учитывалось не только освещение с длиной волны 410 нм, но и индуцированная им флуоресценция CdTe КТ-537 (синий свет и зеленый свет), т.е. облучение БР в системе происходит одновременно, что существенно сказывается на ее параметрах. Авторы считают, что флуоресценция КТ при 537 нм активирует ближайшие молекулы БР и запускает фотоцикл с образованием М-формы (M_{412}) и освобождением протона. В тоже время, стационарное освещение при 410 нм приводит к ускорению дальнейшего превращения М-формы (M_{412}) в МЕ с быстрым захватом протона. В таком случае (когда синий свет применяется в дополнение к зеленому свету), протон не успевает достигнуть внешней поверхности мембраны, так что молекула БР может быстро вернуть его, т.е. протонный насос «шунтируется» [75]. В приведенном выше эксперименте [75] две длины волны освещения накладываться друг на друга на протяжении всего процесса, когда источник света включен. Таким образом, процесс освобождения и захвата протона происходит внутри мембраны неоднократно и очень быстро, т.е. протоны не уходят в межклеточное пространство, что объясняет генерацию стационарного фототока в этих условиях. Следует отметить, что предложенная авторами [68] модель не является достаточно обоснованной, поскольку ряд авторов [5, 11, 76, 77] уже рассматривали одновременное освещение БР двумя источниками света с длинами волн 570 нм и 412 нм. Если использование гибридной системы КТ/БР в такой схеме действительно приводит к указанным авторами [68] специфическим параметрам, что еще требует независимых подтверждений, то это может обеспечить основу для создания новых типов многофункциональных систем.

С другой стороны, авторы [73] предложили необычный метод получения структур с чередующимися слоями КТ/БР, что дает увеличение сигнала БР на 23% по сравнению с БР-электродами без КТ. Авторами были получены 2 системы: I – немодифицированный БР и КТ (575 нм) общей структуры CdSe/ZnS; II — биотинилированный БР, который эффективно связывается со стрептавидиновой оболочкой таких же КТ. Как хорошо известно, константа связывания биотин-стрептавидин составляет 4×10^{-14} М. Система I, где КТ нанесены на поверхность пленки ПМ, характеризуется 54.0% уменьшением флуоресценции КТ по сравнению со стандартным слоем КТ на стекле. Для системы II тушение флуоресценции составляло 43.8%, т.е. небольшое изменение расстояния между КТ и БР (на 1–1.5 нм) за счет оболочки КТ приводит к заметным изменениям флуоресценции КТ. Этот эффект объясняется тем, что процесс ФРПЭ очень чувствителен к расстоянию между донором и акцептором (КТ и БР) в нанометровом диапазоне. Полученные спектры флуоресценции [73] доказывают, что только «биотинилированные» ПМ способны связывать «стрептавидиновые» КТ, увеличивая расстояние между КТ и БР до 6–8 нм. Максимальные величины фотовольтаических параметров при освещении системы II составляют 306 мВ (при включении света) и –200 мВ (при выключении света), тогда как без КТ они равны 249 и –158 мВ, соответственно [73]. Соотношение этих значений изменяется от 1.55 (система ПМ/КТ) до 1.42 (только ПМ на электроде), что совпадает с величиной, ранее полученной для ПМ-электродов в других работах (1.5). Таким образом, использование системы стрептавидин-биотин приводит к специфическому взаимодействию КТ с БР на расстоянии порядка ферстеровского радиуса, что приводит к увеличению на 23% фотовольтаических параметров [73].

Интерес к коммерческой реализации таких систем демонстрирует заявка на патент [71], в которой описана пленочная многослойная структура на основе слоев БР и КТ. В этой работе продемонстрирована возможность получения электрического отклика (скачков потенциала) гибридных систем при фотоактивации. В работе [74] описана нано-биогибридная система, содержащая КТ (CdSe/ZnS) и БР. Показано, что при расстоянии в 3.5 нм между донором и акцептором происходит перенос 88.2% энергии КТ, а при расстоянии в 8.5 нм – 51.1% энергии. Эти данные близки к значению теоретически рассчитанного ферстеровского радиуса для системы КТ/БР, который составляет 7.94 нм. Эффективное время жизни КТ в возбужденном состоянии уменьшилось с 18.0 до 13.3 нс. Авторами обсуждаются возможности систем КТ/БР в солнечных батареях, биосенсорике, оптоэлектронике, биокомпьютерных и других технологиях [74].

Для создания альтернативной системы монослоев КТ и БР на проводящей поверхности ИТО-электрода авторами [72] предложено использовать ионные самоассоциирующиеся монослои (I-SAM). В качестве материала I-SAM выступал хлорид полидиаллилдиметил-аммония (ПДАДМАХ), который наносили на ИТО-электрод методом Ленгмюра-Блоджетт. Затем наносились следующие слои (в скобках – период адсорбции): БР (5 мин), КТ (10 мин), ПДАДМАХ (5 мин). По такой схеме были получены бислойные структуры (БР/ПДАДМАХ и КТ/ПДАДМАХ) и трислои (БР/ПДАДМАХ/КТ) [72]. Показано, что бислои БР/ПДАДМАХ имеют адсорбционный максимум при 568 нм, величина которого линейно увеличивается с возрастанием числа бислоев (авторами исследовано от 2 до 12 бислоев). Однако фотovoltaический ответ пленки I-SAM с адсорбированными 12 бислоями БР/ПДАДМАХ практически соответствовал системе, состоящей из 3 подобных бислоев. С другой стороны, была получена линейная зависимость величины интенсивности максимума флуоресценции КТ (при 570 нм) от числа бислоев КТ/ПДАДМАХ. В дальнейшем таким же образом была изучена тройная система, содержащая следующую последовательность слоев: ИТО–ПДАДМАХ–(БР/ПДАДМАХ/КТ) n , где $n=1-6$ [72]. Эти результаты свидетельствуют о линейном возрастании флуоресценции КТ, если брать только точки, соответствующие полному переносу трислоя, т.е. целым значениям n , причем авторы обнаружили 20% уменьшение флуоресценции КТ для каждого трислоя по сравнению с таковой для бислоя КТ/ПДАДМАХ. Указанный эффект подтверждается тем, что такое же 20% уменьшение флуоресценции КТ наблюдалось и в случае «неполных» трислоев типа ПДАДМАХ/БР на поверхности каждого полного трислоя. Этот эффект тушения флуоресценции объясняется переносом энергии с КТ на БР по типу ФРПЭ, что показывает возможность создания нанобиогибридных структур с контролируемой мультислойной «архитектурой» БР и КТ на поверхности I-SAM.

Thavasi и соавт. [27] опубликовали обширное сравнительное исследование БР дикого типа и его тройного (3Glu) мутанта [E9Q/E194Q/E204Q] в комбинации с широким полупроводником TiO_2 и показали их пригодность в качестве эффективных биосенсибилизированных солнечных батарей. В частности, методом дифференциальной сканирующей калориметрии показана тепловая устойчивость как БР дикого типа, так и его 3Glu-мутанта, а молекулярным моделированием рассчитана благоприятная для электронного переноса привязка БР и 3Glu-мутанта к атомам кислорода в подложке TiO_2 . Из сравнения полученных характеристик таких солнечных элементов следует, что

3Glu-мутант показывает лучшую фотоэлектрическую производительность по сравнению с БР дикого типа, давая плотность фототока короткого замыкания порядка $0.09 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ и фотопотенциал 0.35 В при освещенности $40 \text{ мВт}\cdot\text{см}^{-2}$ [27].

IV. ПЛАЗМОННЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ

ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЛАЗМОННЫХ НАНОЧАСТИЦ

Другим наноразмерным объектом, способным существенно модифицировать свойства БР и получить наногибридные структуры с новыми свойствами, являются плазмонные наночастицы. Помещая их в переменное электрическое поле, можно добиться существенного усиления поля вблизи поверхности наночастиц. Такое усиление поля эффективно при реализации нелинейно-оптических процессов, таких как усиленная поверхностью флуоресценция и комбинационное рассеяние. Суть эффекта заключается в том, переменное электромагнитное поле индуцирует колебания электронов внутри металла и, в случае ограниченного объема электронного газа (локальные плазмоны) возможно возникновение резонанса, что приводит к значительному усилению.

Резонансные частоты локализованных плазмонов определяются оптическими константами металла и формой наночастиц. Для оценки степени усиления электромагнитного поля удобно воспользоваться моделью малого (много меньше длины волны) эллипсоида вращения. Модель имеет аналитическое решение. Исследование этой модели [78–80] позволяет определить, как резонансные частоты, так и значение усиления. Оптические параметры металлов хорошо описываются комплексной диэлектрической проницаемостью материала $\varepsilon = \varepsilon' + i\cdot\varepsilon''$.

В случае простой модельной системы – тело в форме малого эллипсоида вращения ($a, b \ll \lambda$, где a и b – полуоси эллипсоида), помещенного во внешнее световое поле с напряженностью E_0 , направленное вдоль его оси, локальное поле E_{loc} вблизи его вершины определяется выражением [79–81]:

$$E_{\text{loc}}(\omega) = \frac{\varepsilon(\omega)}{1 + \left[\frac{\varepsilon(\omega)}{\varepsilon_m(\omega)} - 1 \right] A} E_0(\omega),$$

где A зависящий от отношения длин полуосей a/b фактор деполаризации эллипсоида $A(a/b) = 1 - \zeta \cdot Q_1'(\zeta)/Q_1(\zeta)$, $\zeta = a/(a^2 - b^2)^{1/2}$, Q_1 и Q_1' – полином Лежандра второго рода и его производная, $\varepsilon_m(\omega)$ – диэлект-

рическая проницаемость среды (для вакуума $\epsilon_m(\omega) = 1$, для воды в диапазоне оптических частот $\epsilon_m(\omega) = 1,77$).

Резонансные эффекты наблюдаются только в той области частот, где действительная часть диэлектрической проницаемости подложки $\epsilon = \epsilon' + i \cdot \epsilon''$ отрицательна: $\epsilon' < 0$. Для металлов это область частот ниже плазменной частоты ω_p , для многих других материалов это условие в оптическом диапазоне недостижимо. Кроме того, усиление E_{loc} зависит от затухания в металле, определяемого мнимой частью ϵ'' . Условием резонанса является обращение в ноль действительной части знаменателя и усиление определяется значением мнимой части. Поскольку знаменатель выражения в условиях резонанса представлен только мнимой частью диэлектрической проницаемости, усиление тем больше, чем меньше ϵ'' .

В случае сферической частицы, значение $A = 1/3$ [80]. Выражение для усиления локального поля упрощается и для случая вакуума ($\epsilon_m(\omega) = 1$):

$$E_{loc}(\omega) = \frac{3\epsilon(\omega)}{2 + \epsilon(\omega)} E_0(\omega).$$

Условием резонанса является частота, при которой $\epsilon' = -2$.

Значения комплексных значений диэлектрической проницаемости некоторых металлов на длине волны 532 нм приведены в таблице.

Для серебра, условие резонанса для малых частиц в вакууме выполняется на длине волны 364 нм. Для серебряного золь в воде, резонанс смещается к 394 нм. Отклонение от сферичности в сторону вытянутого эллипсоида, также смещает положение резонанса в длинноволновую сторону, при этом добротность системы возрастает, что

Таблица. Электрооптические характеристики благородных металлов, используемых для приготовления плазмонных наночастиц (на основании результатов [82])

Металл	$\lambda_{рез}$ в вакууме, нм	Оптические параметры в условия резонанса в вакууме	$\lambda_{рез}$ в воде, нм	Оптические параметры в условия резонанса в воде	Оптические параметры при $\lambda = 532$ нм	Оптические параметры при $\lambda = 570$ нм
		$\epsilon' + i \cdot \epsilon''$		$\epsilon' + i \cdot \epsilon''$	$\epsilon' + i \cdot \epsilon''$	$\epsilon' + i \cdot \epsilon''$
Ag	364	$-2 + i \cdot 0,5$	394	$-3,54 + i \cdot 0,4$	$-11,8 + i \cdot 0,4$	$-13,5 + i \cdot 0,5$
Au	477	$-2 + i \cdot 4,9$	517	$-3,54 + i \cdot 3,2$	$-4,71 + i \cdot 2,4$	$-6,0 + i \cdot 1,6$
Cu	368	$-2 + i \cdot 5,3$	435	$-3,54 + i \cdot 5,6$	$-5,5 + i \cdot 5,8$	$-7,5 + i \cdot 3,2$

проявляется в росте интенсивности резонанса. Кроме того, рост кривизны поверхности вблизи вершины эллипсоида индуцирует рост эффекта «громоотвода» [81], усиления электромагнитного поля вблизи поверхности высокой кривизны.

Достаточно четко выраженный резонанс локальных плазмонов наблюдается только для наночастиц с размерами много меньшими длины волны. В противном случае эффекты запаздывания значительно демпфируют такие резонансы и (при размерах наночастиц порядка длины волны) их роль в возрастании существенно уменьшается. Увеличение размеров наночастиц приводит к появлению длинноволновой полосы поглощения. Для серебряных наночастиц второй пик поглощения появляется в области 500–560 нм. Варьируя форму и структуру наночастиц (формируя, например сферические капсулы или полые наноцилиндры) можно в широких пределах регулировать резонансную частоту и добротность резонансных колебаний электронной плазмы в наночастицах [83].

Появление полосы резонанса в длинноволновой области наблюдаются также при сближении двух и более частиц. При этом, в зазорах между наночастицами интенсивность электромагнитного поля может резко возрастать. В оптической спектроскопии такие локальные области называют «горячими точками». В них удается получать рекордные значения усиления комбинационного рассеяния (эффект гигантского комбинационного рассеяния, ГКР).

Таким образом, выбирая материал наночастицы, ее форму и размеры, можно формировать область усиления электромагнитного поля вблизи молекулы (молекул) БР, подбирая длину волны, соответствующей той или иной форме БР. Благодаря этим привлекательным физико-химическим свойствам, наночастицы могут влиять на фотоцикл БР, в частности ускорять процесс накачки протонов [84, 85]. Таким образом, интеграция бР с AgNP может потенциально позволить создавать эффективные нано-биогибридные системы [84, 86].

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМОННЫХ ЭФФЕКТОВ НА ФОТОЦИКЛ БАКТЕРИОРОДОПСИНА

Важным направлением исследований в этой области является использование влияния на фотоцикл БР плазмонных эффектов поля наночастиц золота и серебра [36, 37, 60, 61, 70, 75], спектры которых перекрываются с М-формой [70]. Показано, что в таких гибридных системах плазмонное поле усиливает как значения фототока и скорость прокачки протонов, так и эффект «синего света», действующий на медленные метаболиты фотоцикла (типа М-формы).

Наглядной иллюстрацией влияния плазмонных полей наночастиц Ag являются зависимости спектральных параметров и кинетики фотоцикла БР от размера наночастиц Ag и облучения системы синим светом, рис. 3 А.

Эксперименты показали, что совместное действие синего света и коротко-импульсного лазерного возбуждения (532 нм) на БР в присутствии наночастиц Ag значительно ускоряет как восстановление основной формы (bR_{568}) из М-формы, так и скорость прокачки протонов, за счет прямого перехода из формы М в основную форму по «обходному» пути за время примерно 200 нс (вместо 15 мс), рис. 3 А. Причем в присутствии наночастиц Ag размером 40 нм скорость превращения М-формы была увеличена в 400 раз по сравнению с таковой в присутствии наночастиц Ag размером 8 нм. Это достигается за счет как гораздо более сильного плазмонного поля, так и более широкого перекрытия полосы поглощения 40 нм наночастиц Ag и М-формы [87]. Указанное значение эффекта хорошо соответствуют теоретической величине (увеличение в 375 раз), рассчитанной по следующим факторам: 1) увеличение плазмонного поля пропорционально размеру наночастиц с коэффициентом пропорциональности 125; 2) из сравнения степени спектрального перекрытия следует трехкратное увеличение скорости передачи энергии между плазмонным полем и М-формой в присутствии 40-нм наночастиц по сравнению 8-нм наночастицами Ag. Дальнейшее изучение этого эффекта [36, 37, 60, 62] показало дополнительные возможности для увеличения фототока, в основном за счет сокращения времени фотоцикла БР. Одним из достижений работы [70] явилось обнаружение трех факторов, улучшающих параметры данного процесса в жидкой электрохимической ячейке.

Во-первых, авторам удалось улучшить разделение носителей зарядов при фотоактивации системы в растворе путем замены обычной пористой мембраны на протон-селективную мембрану «Nafion».

Во-вторых, авторам удалось максимально сохранить плазмонный эффект поля за счет использования поливинилпирролидона (PVP) с $MW = 55$ кДа для создания ультратонкого полимерного покрытия наночастиц, которое минимально уменьшает электромагнитное поле, сохраняя при этом высокую временную стабильность наночастиц по сравнению с частицами, покрытыми другими полимерами с разными молекулярными массами.

В-третьих, авторы использовали специально синтезированные наночастицы заданной формы: кроме сфер, были синтезированы наночастицы кубической формы и кубоиды с участками поверхности

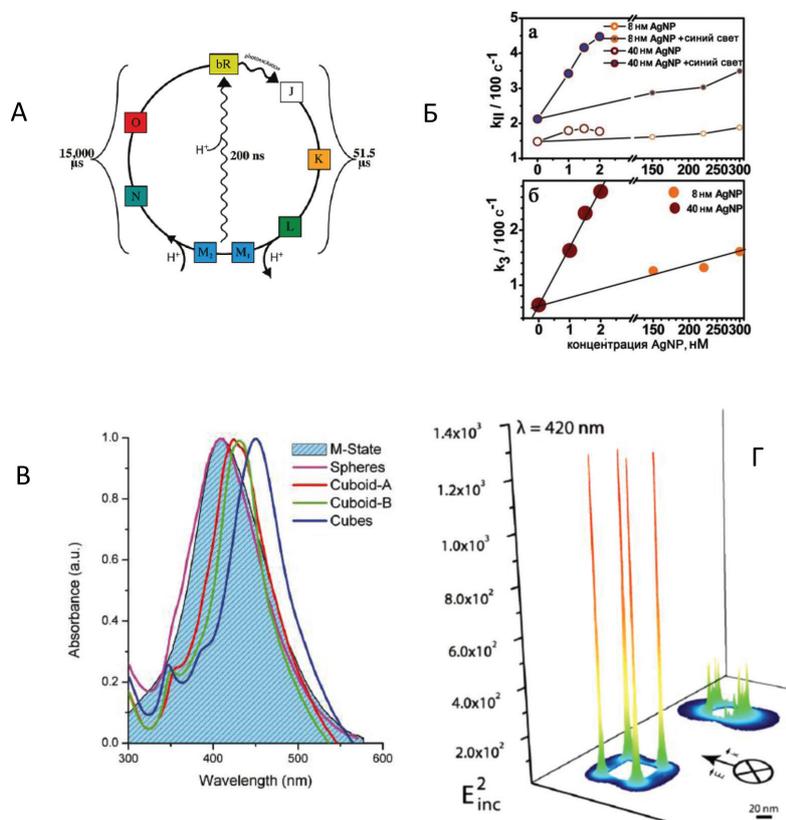


Рис. 3. Влияние плазмонного электромагнитного поля наночастиц Ag (AgNP) на спектральные параметры и кинетику фотоцикла бактериородопсина (БР).

(А) «Обходной» путь релаксации БР из М-формы в основное состояние.

(Б) Константа скорости k_{11} в присутствии и отсутствии облучения БР синим светом при различных концентрациях наночастиц Ag размером 8 и 40 нм (а). Разность между значениями k_{11} в присутствии и отсутствии синего света (б). Разность показывает чувствительность периода фотоцикла к усилению электромагнитного поля (эффект синего света) в зависимости от концентрации и размера используемых частиц.

(В) Эффективность спектрального перекрытия серебряных сфер, кубоидов и кубов размером 40 нм с М-формой БР (заштрихованная область). С увеличением заостренности углов у частиц степень спектрального перекрытия снижается.

(Г) Роль формы в усилении электромагнитного поля в локальных областях вблизи наночастиц: дискретная дипольная аппроксимация трехмерных электрических полей для серебряных сфер диаметром 40 нм (справа) и серебряных кубов с длиной ребра 40 нм (слева). В последнем случае явно проявляется эффект «громоотвода». Адаптировано из [36] (с любезного разрешения издательства American Chemical Society).

высокой кривизны. Наилучшие из них существенно повышали эффективность усиления электромагнитного поля (рис. 3 Г).

Кроме того, авторы разработали элегантную теоретическую модель для объяснения следующего выдающегося результата эксперимента, когда в электрохимической ячейке с мембраной «Nafion», содержащей БР и плазмонные наночастицы (заданной формы и размера), фототок достигал значения порядка $210 \text{ нА}\cdot\text{см}^{-2}$ [36].

Авторы [36] заявили, что это почти в 5000 раз выше, чем в ранее опубликованных данных по фототоку в электрохимических ячейках, содержащих тонкие БР-пленки, что вызывает у нас некоторые сомнения. Действительно, фототок для неориентированных слоев БР дикого типа существенно меньше указанного выше (обычно он составляет $1\text{--}3 \text{ нА}\cdot\text{см}^{-2}$, но может быть увеличен до $4\text{--}6 \text{ нА}\cdot\text{см}^{-2}$ после удаления липидов из образцов БР [75]). В принципе, величины фототока для пленок БР могут быть даже выше $20 \text{ нА}\cdot\text{см}^{-2}$ при достаточно высоком напряжении (500 мВ) в случае некоторых мутантных штаммов БР. Они были получены, например, в работе [75], где метионин (в положении 163) был заменен на цистеин для обеспечения ориентированного связывания БР с поверхностью золотого электрода. С другой стороны, мы уже цитировали выше ряд работ по электрохимическим ячейкам с ЛБ-пленками, имеющими большое число полиэлектролитных слоев, чередующихся с БР (дикого типа или мутантным), в которых величины фототоков составляли от $100\text{--}200 \text{ нА}\cdot\text{см}^{-2}$ [88–90] до $420 \text{ нА}\cdot\text{см}^{-2}$ [91]. В пленках ПМ-ЛШ эта величина колебалась от 50 до $200 \text{ нА}\cdot\text{см}^{-2}$ [92], а в случае ПМ-БЛМ пленок – от 100 до $150 \text{ нА}\cdot\text{см}^{-2}$ [45]. Таким образом, указанные величины фототоков в ранее разработанных системах [45, 88–90, 92] сопоставимы с таковыми, приведенными в работе [36], или даже гораздо больше [91].

Хотя до настоящего времени эффективные пленочные нанобиогибридные системы КТ/БР еще не вышли на коммерческий рынок, но их большое потенциальное значение и перспективность для применения в технике продемонстрирована на вышеуказанных примерах. Таким образом, предложенные в данном обзоре подходы и методы служат основой для создания новых пленочных нанобиогибридных систем (прежде всего КТ/БР), эффективность которых будет выше, чем у существующих сейчас материалов.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОЧАСТИЦ С ПМ

Серебряные наночастицы (AgNPs, AgНЧ) находят все более широкое применение в медицине [93, 94], выступая как цитотоксические агенты, воздействующие на опухоль, так и в качестве носителей

в системах доставки лекарственных агентов к мишеням. В этой связи важным является вопрос взаимодействия наночастиц с биологическими мембранами. Уникальной особенностью AgNPs является возможность их одновременного использования и в качестве исследуемого объекта в процессах взаимодействия с клеточной мембраной, и в качестве зонда, позволяющего получать информацию о взаимодействии методами спектроскопии комбинационного рассеяния (КР). За счет эффекта поверхностного плазмонного резонанса, вблизи AgНЧ, а особенно в малых зазорах между AgНЧ, происходит значительное усиление электромагнитного поля, обуславливающее большое усиление оптических эффектов, в частности усиление комбинационного рассеяния света (гигантское комбинационное рассеяние света, ГКР).

Усиление весьма неоднородно. Наибольшие значения усиления (до 10^9 – 10^{11}) достигаются в ГКР-активных областях, так называемых «горячих точках», как правило, в зазорах между AgНЧ [35, 95]. Необходимо отметить, что именно в этих областях можно ожидать наибольшего влияния AgНЧ на молекулы БР. Таким образом, использование эффекта ГКР позволяет направленно изучать влияние AgНЧ на БР, регистрируя селективный сигнал именно из областей, где влияние AgНЧ на БР максимально. Для получения информации об усредненном влиянии AgНЧ на БР, используют метод флеш-фотолиза [96], позволяющий оценить изменения образования и распада форм БР в процессе фотоцикла, индуцированного коротким лазерным импульсом. В отличие от ГКР, этот метод дает информацию, усредненную по всем молекулам БР.

Метод комбинационного рассеяния света используется для изучения процессов в БР давно. Были разработаны очень тонкие методики получения данных о КР спектрах различных форм БР, выделения форм в чистом виде (низкотемпературные измерения, проточные методы), или выявления характерных спектральных признаков математическими методами. Результаты многолетних исследований просуммированы в прекрасном обзоре [97]). Там же даны исчерпывающие ссылки на первоисточники. Полоса поглощения основной формы БР находится в зеленой области и определяется хромофором БР – ретиналем. Полипептидная часть БР практически прозрачна в этом диапазоне, поэтому зеленый лазер возбуждает колебания главным образом атомов ретиналя, который и определяет спектр КР [98]. Положения и форма линий КР зависят от конформации и распределения зарядов на этой молекуле и отражают как изменения формы самой молекулы, так и ее окружения.

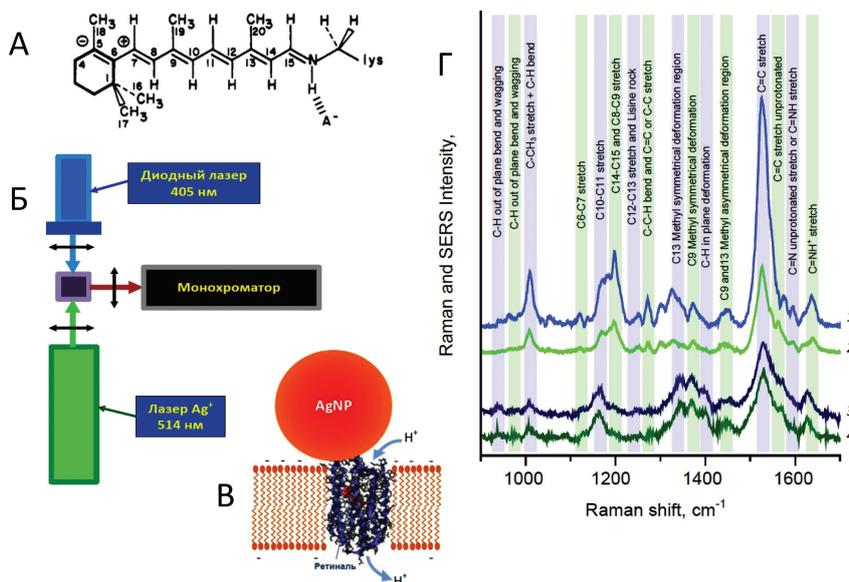


Рис. 4. Схема и нумерация атомов молекулы ретиналя (А); схема двойного облучения конъюгата – (Б); серебряная наночастица, адсорбированная на поверхности фрагмента пурпурной мембраны, содержащей БР – (В). Спектры КР и ГКР конъюгатов БР/AgNPs – (Г).

Спектры КР – 1 и 2, спектры ГКР – 3 и 4. Спектры 2 и 4 записаны при облучении возбуждающим фотоцикл БР излучением зеленого (514 нм) лазера. Спектры 1 и 2, при облучении обоими лазерами: возбуждение – 514 нм и модулирующим, индуцирующим быстрый переход из формы М в основное состояние БР синим (405 нм) лазером.

Спектры КР для некоторых форм БР представлены на рис. 1. Там же отмечены характерные признаки основной формы БР (bR_{568} , линия 1526 см^{-1}), формы M_{412} (линии 1566 см^{-1} и 1621 см^{-1}) и формы O_{640} (линия 1509 см^{-1}). Характерные различия наблюдаются также в области $1150\text{--}1200\text{ см}^{-1}$. Природа и отнесение основных линий спектра КР даны на рис. 4. Группа линий в области $1500\text{--}1650\text{ см}^{-1}$, связана с валентными колебаниями двойных связей $C=C$ и $C=N$ (1640 см^{-1}) [97, 99], группа линий в области $1150\text{--}1200\text{ см}^{-1}$, соответствующая валентным колебаниям одинарных связей $C-C$ основной цепи ретиналя. Относительно сильная линия 1008 см^{-1} , определяется валентными колебаниями $C-CH_3$, при атомах углерода C_9 и C_{13} (нумерация атомов ретиналя приведена на рис. 4 А. Кроме того, в спектре наблюдаются ряд слабых линий в области $1270\text{--}1440\text{ см}^{-1}$, вызванных деформационными колебаниями $C-H$ основной цепи ретиналя и двух его боковых метиленовых групп.

Как уже обсуждалось ранее [70], серебряная наночастица способна влиять на фотоцикл БР, индуцируя быстрый переход БР из M_{412} -формы в основное состояние bR_{568} . В [57] оценена степень этого влияния в зависимости от параметров присоединения AgNP к поверхности ПМ. При адсорбции AgNP на поверхности мембраны может образовываться сильное взаимодействие, образовываться «горячая точка», с высокой эффективностью ГКР. Результирующий спектр ГКР даст информацию исключительно об этих гибридных образованиях с сильной связью БР/AgNP. Сравнение спектров КР (усредненных по всем ПМ) и спектров ГКР (от локальных областей) позволило авторам [57] оценить влияние наночастиц на мембранный белок БР.

Для этого использована методика двух лазеров [57], возбуждающего (514 нм) и модулирующего (405 нм), как показано на рис. 4 Б. Воздействие модулирующего лазера индуцирует быстрый переход БР из М-формы в основную, минуя промежуточную О-форму. Содержание основной формы увеличивается, при условии усиления резонансного возбуждения улучшаются. Это проявляется в увеличении интенсивности спектра КР и, в частности, линии 1526 см^{-1} , интенсивность которой при равных плотностях мощности возбуждающего и модулирующего излучений увеличивается более, чем в 2.5 раза, рис. 4 Г, спектры 1 и 2. Фактор увеличения интенсивности линии 1526 см^{-1} уменьшается с ростом отношения мощности возбуждающего излучения к мощности модулирующего и стремится к единице в отсутствии модулирующего излучения. Фактор изменения интенсивности этой линии, а также отношение интенсивностей линий 1526 см^{-1} (валентные колебания $C=C$ протонированной молекулы ретиналя) и 1566 см^{-1} (то же для непротонированного ретиналя), использованы в качестве индикатора влияния AgНЧ на БР.

Оказалось, что включение/выключение синего лазера никак не влияет на вид и интенсивность спектров ГКР. И это, в свою очередь, означает, что AgNPs в ГКР-активных областях, замораживают состояние БР. Это можно было бы связать с эффектом плазмонного усиления синего излучения наночастицами. Если бы не одно обстоятельство: авторы [57] записали спектры КР одинаковых фрагментов ПМ, в так называемых световой и темновой формах. Световая форма, это БР, хранящийся на свету, он соответствует основной форме bR_{568} и содержит ретиналь в *all-trans* конформации. Известно, что [97] после выдерживания ПМ в темноте (несколько часов), примерно половина молекул ретиналя изомеризуется и переходит в конформацию *13-cis-C=N-cis*. Это, так называемая форма D_{548} с

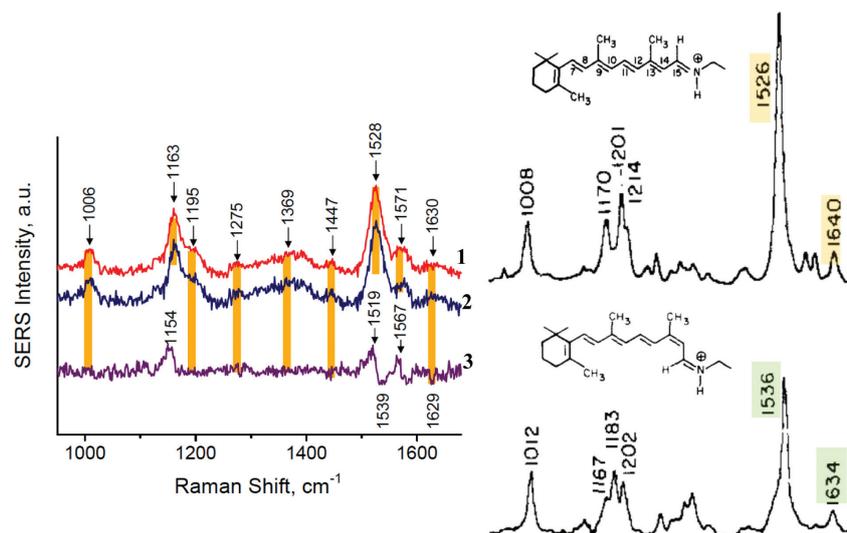


Рис. 5. Слева: спектры ГКР свето-адаптированной (1) и темно-адаптированной (2) форм БР. Спектр (3) – дифференциальный спектр светло-адаптированной минус темно-адаптированной форм БР. Справа: *all-trans* форма ретиналя и КР спектр свето-адаптированной формы (сверху) и ретиналь в конформации 13-*cis*-C=N-*cis* и спектр КР темно-адаптированной формы БР (D_{548}). Спектральные признаки перехода в темно-адаптированную форму: смещение линии 1526 cm^{-1} к положению 1536 cm^{-1} , смещение линии 1640 cm^{-1} к положению 1634 cm^{-1} , исчезновение линий 1580 и 1600 cm^{-1} . Все эти признаки проявляются на дифференциальном спектре (3).

известными КР-спектральными признаками, рис. 5. Спектральные признаки перехода в темно-адаптированную форму: смещение линии 1526 cm^{-1} к положению 1536 cm^{-1} , смещение линии 1640 cm^{-1} к положению 1634 cm^{-1} , исчезновение линий 1580 и 1600 cm^{-1} . Все эти признаки проявляются на дифференциальном спектре (3).

Представленный в [57] результат, фиксации состояния БР наночастицами, получен в отсутствии электромагнитного излучения и включение одного или двух лазеров оказывается неспособным изменить это состояние. Таким образом налицо наличие не электромагнитного механизма фиксации состояния БР. Подчеркнем, что это касается лишь областей с сильным взаимодействием БР/AgNP, в ГКР активных областях.

Вне этих областей влияние наночастиц существенно слабее. Методом флеш-фотолиза [57, 58] показано, что адсорбция AgNPs на

поверхности ПМ, приводит лишь к незначительному сокращению времени фотоцикла. Суть метода флеш-фотолиза заключается в том, что после короткой лазерной вспышки, с длиной волны, соответствующей полосе поглощения основного состояния БР, производится запись изменения поглощения на серии длин волн, соответствующих различным формам БР. Особенностью M_{412} -формы является то, что ее полоса поглощения отстоит далеко от полос поглощения остальных форм. И, если для последних, приходится использовать математический аппарат для выявления врем жизни того или иного состояния, то для процесса депротонирования/протонирования ретиналя (образования и распада M_{412} формы) это следует непосредственно из спектров изменений поглощения на длине волны 412 нм. Метод дает кинетику по всем молекулам БР, находящимся в пробе. Метод не учитывает молекул БР, с «замороженным» фотоциклом. То есть методы КР и флеш-фотолиз, являются взаимодополняющими и демонстрируют существование двух разных процессов: при очень сильном взаимодействии («замораживание» состояния) и при слабом взаимодействии (замедление фотоцикла).

Рост скорости распада M_{412} формы и возврата к основному состоянию bR_{568} означает, сокращение времени прохождения протона от ретиналя на внешнюю сторону ПМ. Но это не дает ответа на вопрос, а какова скорость перемещения протона из цитоплзмы до остатка Asp-96 (аспарагиновая кислота), являющаяся донором протона, необходимого для возврата ретиналя в исходное состояние. В БР дикого типа, процесс возмещения этого протона маскируется достаточно большим временем релаксации БР в основное состояние bR_{568} и временем до возбуждения следующего фотоцикла. Поэтому в [57, 58], в качестве альтернативы, был использован мутант БР с заменой остатка аспарагиновой кислоты на непротонирующийся аспарагин, Asp-96. При этом лимитирующей стадией фотоцикла является доставка протона с внутренней стороны ПМ на ретиналь. Результаты показали, что распад M_{412} формы замедляется.

Таким образом показано, что присутствие AgNPs на поверхности ПМ создает условия для удаления протонов из мембраны: транспорт протона из мембраны ускоряется, а движения протона внутрь мембраны замедляется.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из наиболее перспективных подходов в настоящее время является создание гибридных систем из нескольких функционально и структурно взаимосвязанных наноразмерных компонентов. На первом этапе создания таких систем актуальной задачей является получение ультратонких ориентированных пленок ПМ и БР на границе раздела фаз. На основании сравнения способов получения тонких пленок ПМ и их структурно-функциональных характеристик можно сделать вывод, что однородность и степень ориентации ПМ в таких пленках возрастает в ряду: СА (самосборка) < Ленгмюр-Блоджетт < электрофоретическая седиментация. Следующим этапом является включение в эти системы КТ в качестве своеобразных «антенн-конвертеров» (типа фотосистем растений), что позволяет использовать весь световой спектр (от глубокого УФ до видимой области спектра) и преобразовать эту энергию в фотоны с длинами волн, которые могут поглощаться БР. Эта энергия может эффективно передаваться с КТ на БР в режиме ФРПЭ (Фёрстеровский резонансный перенос энергии) и использоваться для улучшения биологических функций БР. Использование БР особенно удобно еще и потому, что в этом белке хромофор (ретиаль) расположен на расстоянии приблизительно 2.5 нм от обеих поверхностей пурпурной мембраны, что намного меньше среднего ферстеровского радиуса (порядка 5 нм), определенного для многих систем с эффективным переносом энергии в режиме ФРПЭ. Результаты по системам AgNP с БР или его мутантом дают представление о дистанционной зависимости процессов воздействия на мембрану. Так, при максимальной сближенности AgNP с БР может реализоваться механизм сильного воздействия, вплоть до полного замораживания фотоцикла, но с ростом расстояния AgNP /БР, это воздействие слабеет и приводит лишь к ускорению фотоцикла за счет увеличения скорости распада M_{412} -формы БР. Результаты по взаимодействию единичных наночастиц с конкретными белками особенно важны в свете развития бионанотехнологий в направлении локального воздействия на поверхность зондовыми методами и создания гибридных бионаноматериалов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Birge, R.R. (1990) Photophysics and Molecular Electronic Applications of the Rhodopsins, *Annual Review of Physical Chemistry*, **41**, 683–733.
2. Haupts, U., Tittor, J., Oesterhelt, D. (1999) Closing in on bacteriorhodopsin: Progress in Understanding the Molecule, *Annual Review of Biophysics*, **28**, 367–399.
3. Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E., Downing, K.H. (1990) Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy, *Journal of Molecular Biology*, **213**, 899–929.
4. Hong, F.T. (1999) Interfacial photochemistry of retinal proteins, *Recent Progress in Surface Science*, **62**, 1–237.
5. Jin, Y., Honig, T., Ron, I., Friedman, N., Sheves, M., Cahen, D. (2008) Bacteriorhodopsin as an electronic conduction medium for biomolecular electronics, *Chemical Society Reviews*, **37**, 2422.
6. Oesterhelt, D. (1998) The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea, *Current Opinion in Structural Biology*, **8**, 489–500.
7. Subramaniam, S., Henderson, R. (2000) Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin, *Nature*, **406**, 653–657.
8. Wise, K.J., Gillespie, N.B., Stuart, J.A., Krebs, M.P., Birge, R.R. (2002) Optimization of bacteriorhodopsin for bioelectronic devices, *Trends in Biotechnology*, **20**, 387–394.
9. Lavoie, H., Gallant, J., Grandbois, M., Blaudez, D., Desbat, B., Boucher, F., Salsse, C. (1999) The behavior of membrane proteins in monolayers at the gas–water interface: comparison between photosystem II, rhodopsin and bacteriorhodopsin, *Materials Science and Engineering: C, Materials for Biological Applications*, **10**, 147–154.
10. Niemeyer, C.M., Mirkin, C.A. (2004) *Nanobiotechnology*. Wiley-VCH. 491 p.
11. Vsevolodov, N. (1998) *Biomolecular Electronics: an Introduction via Photosensitive Proteins*. Boston: Birkhäuser Boston. 125 p.
12. Рубин А.Б. (1999) *Биофизика*. Москва: Издательство МГУ, 388–456.
13. Adamov, G.E., Devyatkov, A.G., Gnatyuk, L.N., Goldobin, I.S., Grebennikov, E.P. (2008) Bacteriorhodopsin-Perspective biomaterial for molecular nanophotonics, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **196**, 254–261.
14. Audette, G.F., Lombardo, S., Dudzik, J., Arruda, T.M., Kolinski, M., Filipek, S., Mukerjee, S., Kannan, A.M., Thavasi, V., Ramakrishna, S., Chin, M., Somasundaran, P., Viswanathan, S., Keles, R.S., Renugopalakrishnan, V. (2011) Protein hot spots at bio-nano interfaces, *Materials Today*, **14**, 360–365.
15. Oesterhelt, D., Stoeckenius, W. (1971). Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of Halobacterium halobium, *Nature New Biology*, **233**, 149–152.
16. Рубин А.Б. (2000) *Биофизика*. М.: Университет, 388–424.
17. Li, Y.-T., Tian, Y., Tian, H., Tu, T., Gou, G.-Y., Wang, Q., Ren, T.-L. (2018). A Review on Bacteriorhodopsin-Based Bioelectronic Devices, *Sensors*, **18**, 1368.
18. Mahyad, B., Janfaza, S., Hosseini, E. S. (2015). Bio-nano hybrid materials based on bacteriorhodopsin: Potential applications and future strategies, *Advances in Colloid and Interface Science*, **225**, 194–202.
19. Radionov, A.N., Kaulen, A.D. (1995) Cooperative phenomena in the photocycle of D96N mutant bacteriorhodopsin, *FEBS Letters*, **377**, 330–332.

20. Зайцев С.Ю. (2010) Супрамолекулярные наноразмерные системы на границе раздела фаз. Концепции и перспективы для бионанотехнологий. М.: ЛЕНАНД, 202 с.
21. Boucher, J., Trudel, E., Méthot, M., Desmeules, P., Salesse, C. (2007) Organization, structure and activity of proteins in monolayers, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, **58**, 73–90.
22. Зайцев С.Ю., Соловьева Д.О., Набиев И.Р. (2014) Нанобиогибридные структуры на основе организованных пленок фоточувствительных мембранных белков, *Успехи химии*, **83**, 38–81.
23. Drachev, A.L., Drachev, L.A., Kaulen, A.D., Khitrina, L.V. (1984) The action of lanthanum ions and formaldehyde on the proton-pumping function of bacteriorhodopsin, *European Journal of Biochemistry*, **138**, 349–356.
24. Furuno, T., Sasabe, H. (1991) Denaturation of purple membranes at the air/water interface studied by SEM, *Journal of Colloid and Interface Science*, **147**, 225–232.
25. Sukhanova, A., Even-Desrumeaux, K., Kisserli, A., Tabary, T., Reveil, B., Millot, J.M., Chames, P., Baty, D., Artemyev, M., Oleinikov, V., Pluot, M., Cohen, J.H., Nabiev, I. (2012) Oriented conjugates of single-domain antibodies and quantum dots: toward a new generation of ultra-small diagnostic nanoprobe, *Nanomedicine*, **8**, 516–25.
26. Takei, H., Lewis, A., Chen, Z., Nebenzahl, I. (1991) Implementing receptive fields with excitatory and inhibitory optoelectrical responses of bacteriorhodopsin films, *Applied Optics*, **30**, 500–509.
27. Thavasi, V., Lazarova, T., Filipek, S., Kolinski, M., Querol, E., Kumar, A., Ramakrishna, S., Padrós, E., Renugopalakrishnan, V. (2009) Study on the feasibility of bacteriorhodopsin as bio-photosensitizer in excitonic solar cell: a first report, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **9**, 1679–1687.
28. Tittor, J., Schweiger, U., Oesterhelt, D., Bamberg, E. (1994) Inversion of proton translocation in bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T, and D85,96N, *Biophysical Journal*, **67**, 1682–1690.
29. Tkachenko, N.V. (2006) Optical spectroscopy: methods and instrumentations. Elsevier. 322 p.
30. Tóth-Boconádi, R., Dér, A., Keszthelyi, L. (2011) Optical and electric signals from dried oriented purple membrane of bacteriorhodopsins, *Bioelectrochemistry*, **81**, 17–21.
31. Ulman, A. (1991) An introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir-Blodgett to Self-assembly. Boston: Academic Press Inc. 442 p.
32. Weetall, H., Samuelson, L.A. (1998) Optical and electrical-properties of bacteriorhodopsin langmuir-blodgett-films, *Thin Solid Film*, **312**, 306–312.
33. Méthot, M., Desmeules, P., Vaknin, D., Boucher, F., Salesse, C. (2004) In situ characterization of functional purple membrane monolayers at the air-water interface, *Langmuir*, **20**, 934–940.
34. Weetall, H.H. (1994) D96N mutant bacteriorhodopsin immobilized in sol-gel glass characterization, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **49**, 241–256.
35. Xu, H., Bjerneld, E.J., Käll, M., Börjesson, L. (1999) Spectroscopy of Single Hemoglobin Molecules by Surface Enhanced Raman Scattering, *Physical Review Letters*, **83**, 4357–4360.
36. Yen, C.-W., Hayden, S.C., Dreaden, E.C., Szymanski, P., El-Sayed, M.A. (2011) Tailoring Plasmonic and Electrostatic Field Effects To Maximize Solar Energy Conversion by Bacteriorhodopsin, the Other Natural Photosynthetic System, *Nano Letters*, **11**, 3821–3826.

37. Yen, C.W., Chu, L.K., El-Sayed, M. (2010) Plasmonic field enhancement of the bacteriorhodopsin photocurrent during its proton pump photocycle, *Journal of the American Chemical Society*, **132**, 7250–7251.
38. Zaitsev, S.Y., Kozhevnikov, N.M., Barmenkov, Yu.O., Lipovskaya, M.Yu. (1992) Kinetics of dynamic hologram recording in polymer films with immobilized bacteriorhodopsin, *Photochemistry and Photobiology*, **55**, 851–856.
39. Zaitsev, S.Y., Lukashev, E.P., Solovyeva, D.O., Chistyakov, A.A., Oleinikov, V.A. (2014) Controlled influence of quantum dots on purple membranes at interfaces, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, **117**, 248–251.
40. Zaitsev, S.Y., Solovyeva, D.O., Nabiev, I. (2012) Thin films and assemblies of photosensitive membrane proteins and colloidal nanocrystals for engineering of hybrid materials with advanced properties, *Advances in Colloid and Interface Science*, **183–184**, 14–29.
41. Pepe, I.M., Ram, M.K., Paddeu, S., Nicolini, C. (1998) Langmuir–Blodgett films of rhodopsin: an infrared spectroscopic study, *Thin Solid Films*, **327**, 118–122.
42. Dolfi, A., Tadini, B.F., Moncelli, M.R., Guidelli, R. (2002) DC photoelectric signals from bacteriorhodopsin adsorbed on lipid monolayers and thiol/lipid bilayers supported by mercury, *Bioelectrochemistry*, **56**, 151–156.
43. Dolfi, A., Tadini-Buoninsegni, F., Moncelli, M.R., Guidelli, R. (2002) Photocurrents Generated by Bacteriorhodopsin Adsorbed on Thiol / Lipid Bilayers Supported by Mercury, *Langmuir*, **15**, 6345–6355.
44. Ganea, C., Tittorc, J., Bamberg, E., Oesterhelt, D. (1998) Chloride- and pH-dependent proton transport by BR mutant D85N, *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, **1368**, 84–96.
45. Horn, C., Tailoring, C. (2005) Steiner Photocurrents generated by bacteriorhodopsin adsorbed on nanoblack lipid membranes, *Biophysical Journal*, **89**, 1046–1054.
46. Dér, A., Keszthelyi, L. (2001) Bioelectronic Applications of Photochromic Pigments. IOS Press, NATO Science Series. 725 p.
47. Chen, Z., Lewis, A., Takei, H., Nebenzahl, I. (1991) Bacteriorhodopsin oriented in polyvinyl alcohol films as an erasable optical storage medium, *Applied Optics*, **30**, 5188–5196.
48. Manoj, A.G., Narayan, K.S. (2003) Voltage-controlled spectral tuning of photoelectric signals in a conducting polymer-bacteriorhodopsin device, *Applied Physics Letters*, **83**, 3614–3616.
49. Manoj, A.G., Narayan, K.S. (2004) Opto-electrical processes in a conducting polymer-bacteriorhodopsin system, *Biosensors and Bioelectronics*, **19**, 1067–1074.
50. Rakovich, A., Donegan, J. F., Oleinikov, V., Molinari, M., Sukhanova, A., Nabiev, I., Rakovich, Y. P. (2014). Linear and nonlinear optical effects induced by energy transfer from semiconductor nanoparticles to photosynthetic biological systems, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, **20**, 17–32.
51. Олейников В.А., Суханова А.В., Набиев И.Р. (2007) Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в биологии и медицине, *Российские нанотехнологии*, **2**, 160–173.
52. Nabiev, I., Sukhanova, A., Artemyev, M., Oleinikov V. (2008) Fluorescent colloidal particles as detection tools in biotechnology systems. – In the book: Colloidal nanoparticles in bio-

- technology, London-Singapore-NY, WILEY-VCH, 133–168.
53. Васильев Р.Б., Дирин Д.Н., Гаск-ов А. (2011) Коллоидные полупроводниковые нанокристаллы с пространственным разделением носителей заряда: рост и оптические свойства, *Успехи химии*, **80**, 1190–1210.
54. Зайцев С.Ю., Маак Ю., Мёбиус Д., Зубов В.П. (1994) Фотоиндуцированные изменения в моно-слоях бактериородопсина, исследованные методом брустеровского рассеяния, *Биологические мембраны*, **11**, 461–464.
55. Кочергинская П.Б., Романова А.В., Прохоренко И.А., Иткис Д.М., Коршун В.А., Гудилин Е.А., Третьяков Ю.Д. (2011) Модифицирование квантовых точек нуклеиновыми кислотами, *Успехи химии*, **80**, 1209–1221.
56. Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В. (2008) Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы, *Успехи химии*, **77**, 242–269.
57. Олейников В.А., Мочалов К.Е., Соловьева Д.О., Чистяков А.А., Лукашев Е.П., Набиев И.Р. (2016) Влияние серебряных наночастиц на фотоцикл бактериородопсина пурпурных мембран *Halobacterium salinarum*, *Оптика и спектроскопия*, **121**, 227–237.
58. Олейников В.А., Суханова А.В., Набиев И.Р. (2007) Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в биологии и медицине, *Российские нанотехнологии*, **2**, 160–173.
59. Biesso, A., Qian, W., Huang, X., El-Sayed, M.A. (2009) Gold Nanoparticles Surface Plasmon Field Effects on the Proton Pump Process of the Bacteriorhodopsin Photosynthesis, *Journal of the American Chemical Society*, **131**, 2442–2443.
60. Biesso, A., Qian, W., Huang, X., El-Sayed, M.A. (2009) Gold Nanoparticle Plasmonic Field Effect on the Primary Step of the Other Photosynthetic System in Nature, Bacteriorhodopsin, *Journal of the American Chemical Society*, **130**, 3258–3259.
61. Biesso, A., Xu, J., Muñño, P.L., Callis, P.R., Knutson, J.R. (2014) Charge Invariant Protein–Water Relaxation in GB1 via Ultrafast Tryptophan Fluorescence, *Journal of the American Chemical Society*, **136**, 2739–2747.
62. Biesso, A., Zhao, Z., Wang, P., Xu, X., Sheves, M., Jin, Y. (2015) Bacteriorhodopsin/Ag Nanoparticle-Based Hybrid Nano-Bio Electrocatalyst for Efficient and Robust H₂ Evolution from Water, *Journal of the American Chemical Society*, **137**, 2840–2843.
63. Rakovich, A., Sukhanova, A., Bouchonville, N., Lukashev, E., Oleinikov, V., Artemyev, M., Lesnyak, V., Gaponik, N., Molinari, M., Troyon, M., Rakovich, Y.P., Donegan, J.F., Nabiev, I. (2010) Resonance energy transfer improves the biological function of bacteriorhodopsin within a hybrid material built from purple membranes and semiconductor quantum dots, *Nano Letters*, **10**, 2640–2648.
64. Bouchonville, N., Molinari, M., Sukhanova, A., Artemyev, M., Oleinikov, V.A., Troyon, M., Nabiev, I. (2011) Charge-controlled assembling of bacteriorhodopsin and semiconductor quantum dots for fluorescence resonance energy transfer-based nanophotonic applications, *Applied Physics Letters*, **98**, 2–4.
65. Clapp, A.R., Medintz, I.L., Mat-toussi, H. (2006) Förster Resonance Energy Transfer Investigations Using Quantum-Dot Fluorophores, *ChemPhysChem*, **7**, 47–57.

66. Elaissari, A. (2006) Colloidal nanoparticles in biotechnology. Chichester: John Wiley & Sons. 366 p.
67. Hardzei, M., Artemyev, M., Molinari, M., Troyon, M., Sukhanova, A., Nabiev, I. (2012) Comparative Efficiency of Energy Transfer from CdSe-ZnS Quantum Dots or Nanorods to Organic Dye Molecules, *ChemPhysChem*, **13**, 330–335.
68. Li, R., Li, C.M., Bao, H., Bao, Q., Lee, V.S. (2007) Stationary current generated from photocycle of a hybrid bacteriorhodopsin/quantum dot bionanosystem, *Applied Physics Letters*, **91**, 7–10.
69. Nabiev, I., Rakovich, A., Sukhanova, A., Lukashev, E., Zagidullin, V., Pachenko, V., Rakovich, Y.P., Donegan, J.F., Rubin, A.B., Govorov, A.O. (2010) Fluorescent quantum dots as artificial antennas for enhanced light harvesting and energy transfer to photosynthetic reaction centers, *Angewandte Chemie*, **49**, 7217–7221.
70. Chu, L.-K., Yen, C.-W., El-Sayed, M.A. (2010) On the Mechanism of the Plasmonic Field Enhancement of the Solar-to-Electric Energy Conversion by the Other Photosynthetic System in Nature (Bacteriorhodopsin): Kinetic and Spectroscopic Study, *The Journal of Physical Chemistry C*, **114**, 15358–15363.
71. Friedrich, C., Lueking, D., Griep, M. (2008) Bacteriorhodopsin-based sensors. Patent US 2009/0142852.
72. Griep, M., Winder, E., Lueking, D., Friedrich, C., Mallick, G., Karna, S. (2010) Optical protein modulation via quantum dot coupling and use of a hybrid sensor protein, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **10**, 6029–6035.
73. Griep, M.H., Walczak, K.A., Winder, E.M., Lueking, D.R., Friedrich, C.R. (2010) Quantum dot enhancement of bacteriorhodopsin-based electrodes, *Biosensors and Bioelectronics*, **25**, 1493–1497.
74. Griep, M.H., Winder, E.M., Lueking, D.R., Garrett, G.A., Karna, S.P., Friedrich, C.R. (2012) Förster Resonance Energy Transfer between Core/Shell Quantum Dots and Bacteriorhodopsin, *Molecular Biology International*, **2012**, 1–7.
75. Patil, A.V., Premaruban, V.T., Berthoumieu, O., Watts, A., Davis, J.J. (2012) Enhanced Photocurrent in Engineered Bacteriorhodopsin Monolayer, *The Journal of Physical Chemistry B*, **116**, 683–689.
76. Green, M.A., Emery, K., Hishikawa, Y., Warta, W., Dunlop, E.D. (2010) Solar cell efficiency tables (version 36), *Progress in Photovoltaics: Research and Applications*, **18**, 346–352.
77. Stuart, J., Marcy, D.L., Wise, K.J., Birge, R.R. (2002) Volumetric optical memory based on bacteriorhodopsin, *Synth. Met.*, **127**, 3–15.
78. Ченг П., Фуртак Т. (1984) Гигантское комбинационное рассеяние. М.: Мир., 408 с.
79. Boyd, G.T., Rasing, Th., Leite, J.R.R., Shen, Y.R. (1984) Local-field enhancement on rough surfaces of metal, semimetals, and semiconductors with the use of optical second-harmonic generation, *Physical Review B*, **30**, 519–526.
80. Barber, P. W., Chang, R. K., Mas-soudi, H. (1983) Electrodynamic calculations of the surface-enhanced electric intensities on large Ag spheroids, *Physical Review B*, **27**, 7251–7261.
81. Ермушев А.В., Мчедлишвили Б.В., Олейников В.А., Петухов А.В. (1993) Поверхностное усиление локальных световых полей и эффект «громоотвода», *Квантовая электроника*, **20**, 503–509.
82. Johnson, P. B., Christy, R. W. (1972) Optical Constants of the Noble Me-

- tals. *Physical Review B*, **6**, 4370–4379.
83. Куделина И.А., Мурзина Т.В., Мчедлишвили Б.В., Олейников В.А., Петухов А.В., Соколов К.В. (1991) Резонансы локализованных плазмонов полых металлических цилиндров в гигантском комбинационном рассеянии и генерации гигантской второй гармоники, *Поверхность. Физика, химия механика*, **10**, 75–80
84. Yen, C.-W., Hayden, S. C., Dreaden, E. C., Szymanski, P., El-Sayed, M. A. (2011). Tailoring Plasmonic and Electrostatic Field Effects To Maximize Solar Energy Conversion by Bacteriorhodopsin, the Other Natural Photosynthetic System, *Nano Letters*, **11**, 3821–3826.
85. Adamov, G. E., Goldobin, I. S., Grebennikov, E. P., Devyatkov, A. G. (2008). Hybrid nanostructures based on nanoparticles and bacteriorhodopsin, *High Energy Chemistry*, **42**, 522–523.
86. Zhao, Z., Wang, P., Xu, X., Sheves, M., Jin, Y. (2015). Bacteriorhodopsin/Ag Nanoparticle-Based Hybrid Nano-Bio Electrocatalyst for Efficient and Robust H₂ Evolution from Water, *Journal of the American Chemical Society*, **137**, 2840–2843.
87. Renugopalakrishnan, V., Barbiellini, B., King, C., Molinari, M., Mochalov, K., Sukhanova, A., Nabiev, I., Fojan, P., Tuller, H.L., Chin, M., Somasundaran, P., Padrós, E., Ramakrishna, S. (2014) Engineering a robust photovoltaic device with quantum dots and bacteriorhodopsin, *The Journal of Physical Chemistry C*, **118**, 16710–16717.
88. Chu, J., Li, X., Zhang, J., Tang, J. (2003) Fabrication and photoelectric response of poly(allylamine hydrochloride)/PM thin films by layer-by-layer deposition technique, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **305**, 116–121.
89. He, J., Samuelson, L., Li, L., Kumar, J., Tripathy, S.K. (1998) Oriented Bacteriorhodopsin / Polycation Multilayers by Electrostatic Layer-by-Layer Assembly, *Langmuir*, **7463**, 1674–1679.
90. He, J.-A., Samuelson, L., Li, L., Kumar, J., Tripathy, S.K. (1998) Photoelectric Properties of Oriented Bacteriorhodopsin/Polycation Multilayers by Electrostatic Layer-by-Layer Assembly, *The Journal of Physical Chemistry B*, **102**, 7067–7072.
91. Li, R., Cui, X., Hu, W., Lu, Z., Li, C. (2010) Ming Fabrication of oriented poly-l-lysine/bacteriorhodopsin-embedded purple membrane multilayer structure for enhanced photoelectric response, *Journal of Colloid and Interface Science*, **344**, 150–157.
92. Miyasaka, T., Koyama, K. (1992) Rectified photocurrents from purple membrane Langmuir-Blodgett films at the electrode-electrolyte interface, *Thin Solid Films*, **210**, 146–149.
93. Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z.-S., & Chen, G. (2015) Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications, *Drug Discovery Today*, **20**, 595–601.
94. Lee, S.H., Jun, B-H. (2019) Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine, *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 865.
95. Ru, E.C. Le., Etchegoin, P.G., Meyer, M. (2006) Enhancement factor distribution around a single surface-enhanced Raman scattering hot spot and its relation to single molecule detection, *The Journal of Chemical Physics*, **125**, 204701.
96. Oesterhelt, D., Stoeckenius, W. (1974) Isolation of the cell membrane of Halobacterium halobium and its fractionation into red and purple membrane, *Methods in Enzymology*, **31**, 667–678.

97. Smith, S.O., Lugtenburg, J., Mathies, R.A. (1985) Determination of retinal chromophore structure in bacteriorhodopsin with resonance Raman spectroscopy, *The Journal of Membrane Biology*, **85**, 95–109.
98. Nabiev, I.R., Chumanov, G.D., Efremov, R.G. (1990) Surface-enhanced Raman spectroscopy of biomolecules. Part II. Application of short- and long-range components of SERS to the study of the structure and function of membrane proteins, *Journal of Raman Spectroscopy*, **21**, 49–53.
99. Saito, S., Tasumi, M. (1983) Normal-coordinate analysis of retinal isomers and assignments of Raman and infrared bands, *Journal of Raman Spectroscopy*, **14**, 236–245.